



УДК 57.013

РЕАКЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ КРЫС НА РАСТВОРИМЫЕ И НЕРАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ МЕТАЛЛОВ В ОПЫТАХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Н. А. Павлов
С. В. Надеждин

Белгородский
государственный
университет,
Россия, 308007, г. Белгород,
ул. Студенческая, 14
E-mail: ncpvbl@gmail.com

В работе проведено изучение влияния ионов кальция и наночастиц железа на морфометрические параметры и функциональные свойства лейкоцитов крови. Повышение концентрации ионов кальция в питьевой воде приводит к изменениям морфометрических характеристик белых клеток крови. Мембранный резерв нейтрофилов используют больше, чем лимфоциты, а восстановление исходного объема клеток происходит эффективнее у лимфоцитов в отличие от нейтрофилов. Ионы кальция при непосредственном воздействии на лейкоциты вызывают увеличение объема клеток. Инкубация белых клеток с наночастицами железа приводит к изменению функциональных свойств плазмалеммы с увеличением ее проницаемости.

Ключевые слова: лейкоциты, кальций, наночастицы железа.

Введение

Наиболее распространенными в окружающей среде патогенными агентами являются растворимые и нерастворимые формы металлов, поступающие в организм преимущественно алиментарным путем. В связи с этим, особый интерес представляют данные о воздействии ионов кальция и наночастиц железа на белые клетки крови, защищающие организм от воздействий внешних и внутренних факторов. Ионы кальция обладают множеством эффектов по отношению к гемоцитам. Установлено, что Ca^{2+} снижает активность 5-липноксигеназы лимфоцитов, приводя к угнетению синтеза лейкотриенов [1], влияет на процесс фагоцитоза и миграцию нейтрофилов [2,3]. О воздействии наночастиц железа на лейкоциты свидетельствуют единичные работы. Было показано, что внутривенное введение крысам 20 мг/кг наночастиц железа (ferumoxides), обладающих магнитными свойствами, не приводило к гибели белых клеток крови [4].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния повышенной концентрации Ca^{2+} и наночастиц железа на некоторые морфофункциональные свойства лейкоцитов.

Материал и методы

Работа выполнена на белых клетках крови лабораторных крыс линии Вистар. Для изучения влияния ионов кальция и наночастиц железа на морфометрические параметры и функциональные свойства лейкоцитов было проведено 2 серии опытов.

В первой серии исследовали воздействие Ca^{2+} на гемоциты в опытах *in vivo* и *in vitro*. Животных экспериментальной группы в течение 6 месяцев поили жесткой водой, концентрация Ca^{2+} составляла 66.5 мг/л – опытная группа, контрольная группа получала имитаты питьевой воды с концентрацией Ca^{2+} 9.75 мг/л. Полученную суспензию лейкоцитов использовали для оценки осморегуляторных реакций и мембранного резерва белых клеток крови при помощи комплексного метода [5].

Для опытов *in vitro* суспензию лейкоцитов получали общепринятым методом, затем делили на 2 части и добавляли раствор CaCl_2 . Первая часть суспензии являлась контролем; концентрация Ca^{2+} составляла 2.23 ммоль/л, во второй части концентрация Ca^{2+} равнялась 2.52 ммоль/л – опытная группа. Содержание Ca^{2+} в контрольной группе соответствовало содержанию Ca^{2+} в сыворотке крови крыс интактной группы в опытах *in vivo*, а в опытной группе равнялась концентрации Ca^{2+} в сыворотке крови животных, употреблявших жесткую воду. Суспензии белых клеток инкубировали 30



мин в термостате при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Для оценки использования мембранного резерва лейкоциты подвергали гипосмотическим нагрузкам в 0.2 % растворе NaCl . После всех экспозиционных нагрузок готовили мазки, которые фиксировали глutarовым альдегидом. Клетки сканировали на атомно-силовом микроскопе «ИНТЕГРА Вита» (НТ-MDT, Россия) полуконтактным методом с последующим определением морфометрических показателей (диаметра, высоты, объема, площади поверхности клеток). По измеренным геометрическим характеристикам рассчитывали коэффициент уплощенности (КУ) – отношение площади эллипса (проекция в плоскости длинных осей) к их высоте – с последующей оценкой пластичности клеток.

Во второй серии опытов изучали воздействие наночастиц железа на функциональные свойства (проницаемость плазмалеммы) лейкоцитов. Для этого суспензию белых клеток делили на две части: первая часть служила контролем, во вторую добавляли раствор наночастиц железа в концентрации 10^{-6} М – опытная группа. Суспензии белых клеток инкубировали в термостате в течение 30 минут при $+37^{\circ}\text{C}$. Затем лейкоциты переносили из пробирок в чашки Петри (SPL Lifesciences), добавляли 0.5 ?l 1 mM *Calcein-AM* (Cat. C3100MP, Molecular Probes, Inc. USA) и снова инкубировали в термостате 30 минут при $+37^{\circ}\text{C}$. По завершении времени инкубации чашки Петри извлекали из термостата и помещали на предметный столик конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon Eclipse C1 plus. При помощи программного обеспечения EZ-C1 оценивали интенсивность флуоресценции лейкоцитов контрольной и опытной групп. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента и критерию Вилкоксона.

Результаты исследования и их обсуждение

В экспериментах *in vivo* по изучению влияния Ca^{2+} было выявлено, что мембранный резерв использовался примерно одинаково лимфоцитами контрольной и опытной группы животных, употреблявших жесткую воду. Увеличение диаметра клеток после инкубации в 0.2 % растворе NaCl составляло 26.4 % – контрольная группа и 25.4 % – опытная группа. Мембранный резерв нейтрофилов в опытной группе использовался эффективнее, чем в контрольной группе животных. Увеличение диаметра гематоцитов после инкубации в 0.2 % растворе NaCl составляло 24.1 % в опытной группе и 20.7 % в группе контроля (табл. 1).

Таблица 1

Диаметры лейкоцитов в изотоническом и сильно-гипотоническом растворах хлорида натрия ($M \pm m$)

Группа	NaCl 0.9 %		NaCl 0.2 %, 60 с	
	нейтрофилы, мкм	лимфоциты, мкм	нейтрофилы, мкм	лимфоциты, мкм
Контроль	9.2 ± 0.06	6.7 ± 0.04	$11.1 \pm 0.06^*$	$8.4 \pm 0.05^*$
Опыт	8.7 ± 0.06	6.7 ± 0.04	$10.8 \pm 0.06^{*?}$	$8.4 \pm 0.04^*$

* – достоверность различий по сравнению с изотоническим раствором (0.9% NaCl) ($p < 0.01$);

? – достоверность различий по сравнению с интактными животными ($p < 0.01$).

Осморегуляторные реакции, характеризующиеся восстановлением размера клеток после длительной инкубации (1 час) в 0.45 % растворе NaCl , эффективнее проявлялись у лимфоцитов по сравнению с нейтрофилами (табл. 2). В опытной группе восстановление исходного объема было менее эффективным как у лимфоцитов, так и у нейтрофилов по сравнению с группой контроля.

В опытах *in vitro* было установлено увеличение объема лейкоцитов в опытной группе при экспозиции в изо- и гипотоническом растворах NaCl по сравнению с контролем. Объем белых клеток крови в опытной группе составлял 80.8 ± 10.3 мкм³ (0.9% раствор NaCl) и 96.7 ± 11.9 мкм³ (0.2% раствор NaCl), а в контрольной группе 54.9 ± 9.2 мкм³ и 87.4 ± 44.7 мкм³, соответственно. В опытной группе при инкубации в 0.2% растворе NaCl объем увеличивается на 19.7%, тогда как в контрольной группе этот показатель составляет 59.0% ($p < 0.05$) (рис. 1).

Таблица 2

Диаметры лейкоцитов в изотоническом и умеренно-гипотоническом растворах хлорида натрия при разном времени инкубации, $M \pm m$

Группа	Лейкоциты	$NaCl$ 0.9%	$NaCl$ 0.45%. Время инкубации - 60 секунд	$NaCl$ 0.45%. Время инкубации - 1 час
Контроль	лимфоциты	6.7 ± 0.04	$7.4 \pm 0.04^*$	6.9 ± 0.04
Опыт		6.7 ± 0.04	$7.6 \pm 0.05^{*a}$	7.0 ± 0.04^o
Контроль	нейтрофилы	9.2 ± 0.06	$9.9 \pm 0.07^*$	9.5 ± 0.08^o
Опыт		8.7 ± 0.06	$9.7 \pm 0.07^*$	9.2 ± 0.07^o

* — достоверность различий по сравнению с 0.9% раствором $NaCl$ ($p < 0.01$).

? — достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

^o — достоверность различий по сравнению с 0.45 % раствором $NaCl$ (время инкубации 60 с) ($p < 0.01$).

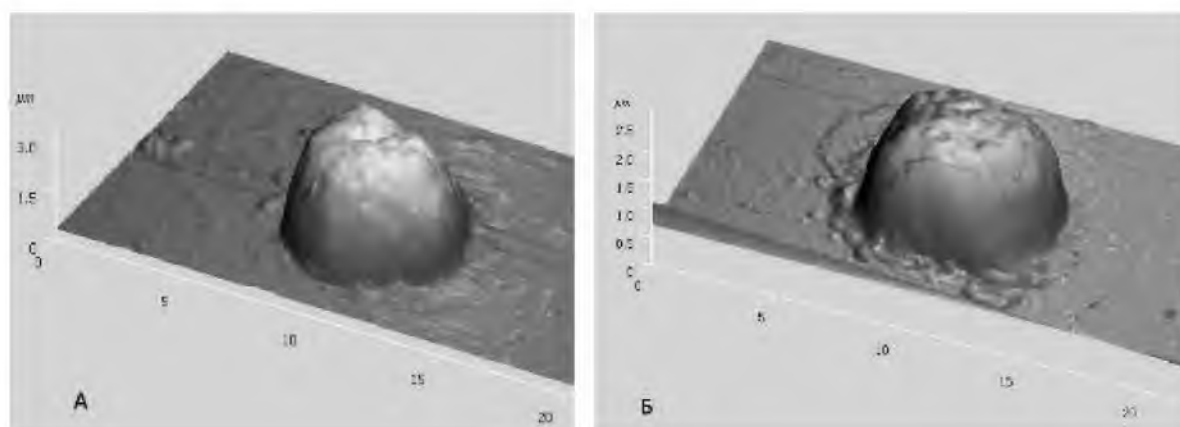


Рис. 1. АСМ изображение лейкоцитов, подверженных кальциевой нагрузке, при инкубации в 0.9 % (А) и 0.2 % (Б) растворе $NaCl$

Параметры высоты белых клеток опытной группы превышали значения, полученные в контрольной группе, на 36.4 %. Значения коэффициента уплощенности лейкоцитов опытной группы свидетельствуют о снижении распластанности белых клеток крови в результате воздействия повышенной концентрации ионов кальция на 23% (0.9 % раствор $NaCl$) и на 41 % (0.2% раствор $NaCl$) (табл. 3).

Таблица 3

Показатели высоты лейкоцитов крови ($M \pm m$)

Группа	Средняя высота клеток, мкм		Коэффициент уплощенности	
	$NaCl$ (0.9 %)	$NaCl$ (0.2 %)	$NaCl$ (0.9 %)	$NaCl$ (0.2 %)
Контроль	1.1 ± 0.19	1.1 ± 0.37	74.1 ± 21.84	109.7 ± 38.64^b
Ca^{2+} 2.52 ммоль/л	1.5 ± 0.13^a	1.5 ± 0.23^a	56.9 ± 10.26^a	64.8 ± 11.28^{ab}

^a — достоверность различий по сравнению с контрольной группой (непарный критерий Вилкоксона, $p < 0.05$).

^b — достоверность различий по сравнению с изотоническим раствором (непарный критерий Вилкоксона, $p < 0.05$).

Во второй серии опытов было установлено, что при инкубации суспензии лейкоцитов с наноразмерными частицами железа изменяются функциональные свойства лейкоцитов. Об этом свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции клеток опытной группы (1178.1 ± 11.43 , отн. ед.) на 6.2 % по сравнению с контрольной группой (1109.9 ± 9.26 отн. ед.). Выявлено, что наночастицы железа оказывают воздействия на цитоплазматическую мембрану лейкоцитов, увеличивая ее проницаемость.



Заключение

Повышение концентрации ионов кальция в питьевой воде приводит к изменениям морфометрических характеристик белых клеток крови крыс. Использование мембранного резерва нейтрофилами происходит эффективнее по сравнению с лимфоцитами. Осморегуляторные реакции реализуются менее выражено лейкоцитами опытной группы по сравнению с контролем. Восстановление исходного объема клеток происходит эффективнее у лимфоцитов по сравнению с нейтрофилами. Ионы кальция при непосредственном воздействии на лейкоциты способствуют увеличению объема клеток по сравнению с контролем. Рост показателей объема лейкоцитов после инкубации в растворе с повышенной концентрацией кальция осуществляется вследствие увеличения высоты белых клеток крови, а не за счет их распластанности на поверхности подложки. Инкубация белых клеток с наночастицами железа приводит к изменению функциональных свойств плазмалеммы с увеличением ее проницаемости.

Список литературы

1. Rouzer C.A., Samuelsson B. Reversible, calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5-lipoxygenase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – Vol. 84. – P. 7393-7397.
2. Bengtsson T., Jaconi M. E., Gustafson M., Magnusson K. E., Theler J. M., Lew D. P., Stendahl O. Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium // Eur. J. Cell Biol. – 1993. – Vol. 62. – P. 49-58.
3. Mandeville J. T., Maxfield F. R. Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices // J. Cell. Physiol. – 1997. – Vol. 171. – P. 168-178.
4. Wu Y.J., Muldoon L.L., Varallyay C., Markwardt S., Jones R.E., Neuwelt E.A. In vivo leukocyte labeling with intravenous ferumoxides/protamine sulfate complex and in vitro characterization for cellular magnetic resonance imaging // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007. – Vol. 293. – P. 1698-1708.
5. Федорова М.З., Левин В.Н. // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 11. – С. 44-46.

Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме: «Клеточный ответ на растворимые и нерастворимые (в форме наночастиц) металлы в опытах in vivo и in vitro» (шифр заявки «2010-1.3.2-203-002-010»).

RATS LEUKOCYTES RESPONSE TO SOLUBLE AND INSOLUBLE FORMS OF METALS EXPERIMENTS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

N. A. Pavlov
S. V. Nadezhdin

*Belgorod State University,
Studencheskaja St, 14,
Belgorod, 308007, Russia
E-mail: ncpvbl@gmail.com*

There has been held an investigation of calcium and iron nanoparticles influence on the morphometric and functional properties of leukocytes. The increase of calcium concentration in drinking water leads to the changes of leukocytes' morphometric parameters. The usage of membrane reserve by neutrophils is higher in comparison with lymphocytes while blood cells' osmoregulation reactions are more effectively used by lymphocytes in contrast to neutrophils. The influence of calcium ions on leukocytes promotes the growth of the cell volume. The increase of leukocytes' volume indices after incubation with high concentration of calcium solution arises from cells' height growth. Incubation of blood cells with iron nanoparticles leads to the increase of leukocytes' membrane permeability which is characterized by increment of the white blood cells' fluorescence intension.

Key words: leukocytes, calcium, iron nanoparticles.